

AE

PRIMER SET FOR DETECTING HERPES ZOSTER VARICELLOSUS VIRUS AND  
DETECTION OF THE VIRUS USING THE SET

Patent Number: JP7000199

Publication date: 1995-01-06

Inventor(s): MATSUMOTO YOICHI; others: 03

Applicant(s):: TEIJIN LTD

Requested Patent: JP7000199

Application Number: JP19930170817 19930618

Priority Number(s):

IPC Classification: C12Q1/70

EC Classification:

Equivalents:

-----  
Abstract  
-----

PURPOSE: To obtain a primer set for PCR, enabling early diagnosis of infection with human herpes zoster varicellous virus, effective for the detection of the virus in high sensitivity independent of the kind of the virus strain and free from cross-reactivity with allied viruses.

CONSTITUTION: A primer set for PCR capable of amplifying a part of region coding glycoprotein II among the genom DNA of human herpes zoster varicellous virus. A method for detecting the virus using the primer set.

-----  
Data supplied from the esp@cenet database - 12

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-199

(43) 公開日 平成7年(1995)1月6日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 Q 1/70

識別記号

Z N A

庁内整理番号

9453-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平5-170817

(22) 出願日 平成5年(1993)6月18日

(71) 出願人 000003001

帝人株式会社

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

(72) 発明者 松本 洋一

東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 菅野 徹

東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内

(72) 発明者 村上 敏信

東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内

(74) 代理人 弁理士 前田 純博

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水痘帯状疱疹ウイルス検出用プライマーセット及びそれを用いる同ウイルスの検出方法

(57) 【要約】

【目的】 ヒト水痘帯状疱疹ウイルス感染の早期診断を可能にする、同ウイルス検出のための、高感度でウイルス株の種類に依存せず、しかも近縁ウイルスとは交差反応性のないPCR用プライマーセットを提供する。

【構成】 ヒト水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムDNAのうち、グリコプロテインIIをコードする領域の一部を増幅せしめることのできるPCR用プライマーセット。また、それを用いた同ウイルスの検出方法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムDNAのうち、グリコプロテインIIをコードする領域の一部をPCR法により増幅することのできるPCR用プライマーセット。

【請求項2】 増幅されるグリコプロテインIIをコードする領域の一部が、水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムDNAの58823番目の塩基から、59161番目の塩基までの領域の全部またはその一部である請求項1に記載のプライマーセット。

【請求項3】 プライマーセットのうち一方は、5'-CGTGAAATCGCAGTCCATGATGTGG-3'であり、また、もう一方が、5'-CGTGGTAAATCCGTGTACGGTGGAA-3'である請求項2に記載のプライマーセット。

【請求項4】 水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムDNAのうち、グリコプロテインIIをコードする領域の一部をPCR法により増幅する過程を含むことを特徴とする水痘帯状疱疹ウイルスの検出方法。

【請求項5】 増幅されるグリコプロテインIIをコードする領域の一部が、水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムDNAの58823番目の塩基から、59161番目の塩基までの領域の全部またはその一部である請求項4に記載の水痘帯状疱疹ウイルスの検出方法。

【請求項6】 プライマーセットのうち一方は、5'-CGTGAAATCGCAGTCCATGATGTGG-3'であり、また、もう一方が、5'-CGTGGTAAATCCGTGTACGGTGGAA-3'であるプライマーセットを用いる請求項5に記載の水痘帯状疱疹ウイルスの検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、水痘帯状疱疹ウイルス(Varicella-Zoster Virus)を早期かつ高感度に検出するための特異的なPCR用プライマーセット、及びそれを用いる同ウイルスの迅速、簡便な検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】水痘帯状疱疹ウイルス(以下「VZV」という)は、 $\alpha$ ヘルペスウイルス群に属し、約125kbpの塩基配列からなる線状2本鎖DNAを有するウイルスである。VZVゲノムの全塩基配列については、Davison and Scott (J. General Virology 67, 1986, 1759-1816)により決定されており、同配列上にVZVに必須なタンパクであるMajor Capsid Protein (MCP)、グリコプロテインI (gpI)、グリコプロテインII (gpII)、グリコプロテインIII (gpIII)等がコードされていることもわかっている。

【0003】VZVはヒトを宿主とし、初感染である水痘の後、脊髄神経節に潜伏し、再活性化して帯状疱疹を引き起こすことが知られている。VZVの感染経路は、

2

水痘患者の鼻咽頭粘膜及び皮膚水痘内、または帯状疱疹患者の皮膚水痘内に存在するウイルスが直接接触するか、もしくは水痘内溶液の呼吸器への散布による。通常、予後は良好で、1~2週間で全治する。しかし、免疫抑制状態(免疫抑制剤使用、悪性腫瘍、免疫不全等の基礎疾患)のヒトがVZVに初感染、あるいは再活性化した場合、重症化し、時に致命的になることがあるため、早期治療を行うための迅速診断法の確立が望まれている。

10 【0004】一方、現在のVZV診断法としては血清学的診断法(補体結合反応、中和試験、FAMA法、ELISA等)が中心である。しかし、血清学的診断法では、VZVの近縁ウイルス(Herpes Simplex Virus: HSV等)との交差反応が観察され、特異性に問題がある(水痘帯状疱疹、高橋理明、新村真人編、メディカルトリビューン1987, 39~54)。他に、ウイルス分離法もVZVの確定法として用いられるが、その判定には熟練を要し、2~3週間掛かるため、迅速性に欠ける上、分離率も低い。

20 【0005】近年、VZVの迅速診断法として、ポリメラーゼチェーンリアクション法(以下「PCR法」という)(Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al., Science, 1985; 230: 1350~1354)の応用が注目されている。PCR法は、in vitroで極微量の核酸を試料として、特定の領域のDNA塩基配列を選択的に増幅する技術である。その基本は、DNA塩基配列の特定の領域の両端で対合する1対の合成オリゴヌクレオチドプライマー(以下「プライマーセット」という)を用い、変性→再アニーリング→伸長反応の各ステップを、耐熱性DNAポリメラーゼ等を用いて繰り返すことにある。したがって、プライマー結合領域として、種特異的な塩基配列を選択することにより、高い特異性をもった検出が可能であり、更に指数関数的な増幅が行えるので、他の診断法に比べ、微量のサンプルからの高感度な検出を行うことができる点で優れている。また数時間の反応で結果が得られることから、迅速診断の手段として適しており、VZVの診断法としても試みられている。

40 【0006】PCR法を用いたVZVの診断法の研究は、そのいずれも、迅速性、高感度、特異性を目指してなされている。それらの結果は、たしかに血清学的診断法およびウイルス分離法に比べて、VZVの臨床症状とより相関のあるデータを示している。しかし、PCR法を用いても現時点でVZVの診断に必要な感度を得るには、Nested double PCR法を行った後、増幅産物をラジオアイソトープ( $^{32}$ P)を用いたdot-blot法で解析しなければならなかった。従って、操作が煩雑で時間が掛かり、ラジオアイソトープ使用可能な限られた施設でしか行えない点が非常に不便であるため、PCR法の特徴が生かされていなかった(Kido S, Ozaki T e

t. al., J. Clinical Microbiol. 1991; 29: 76~79, Dlugosch D, Eis-Hublinger A.M. et. al., J. Med. Virol., 1991; 35 (2): 136~141, Koropchak C.M. et. al., J. Infect. Dis., 1991; 163: 1016~1022, Lowry P.W. et. al., J. Infect. Dis., 1993; 167: 78~83)。

【0007】そこでラジオアイソトープを用いず、高感度で簡便、かつ短時間にVZVを検出できる系が望まれていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、VZVをPCR法により高感度に検出することができ、かつ、HSV等の近縁ウイルスと交差しないPCR用プライマーセット及びそれを用いたVZVの検出方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明はVZVをPCR法により高感度に検出でき、かつ近縁ウイルスと交差しないPCR用プライマーセットを提供することからなる。

【0010】ところで、特定の塩基配列の有無をPCR法により検出するにあたっては、その塩基配列のいかなる部分に対応するプライマーセットを選択するかが重要である。プライマーセットの結合位置によってPCR法による増幅効率が増減することが知られているからである。そして、この予測は一般に困難である。

【0011】そこで、発明者らは次のような観点からVZVのグリコプロテインIIをコードする領域の一部を増幅し得るプライマーセットを選択した。すなわち、VZVの全塩基配列中から(1)プライマー末端がグアニンもしくはシトシンである8塩基以上30塩基以下、特に好ましくは20塩基ないし25塩基からなるプライマーセット、(2)プライマー中のグアニン、シトシン含量が50%程度でプライマーの全範囲を通じてその偏りがなく、特にアデニンまたはチミンが7残基以上並ぶことがなく、グアニンまたはシトシンが6残基以上ならぶことがないプライマーセット、(3)そのプライマーセットを用いたPCR法による増幅産物が100bpないし500bpであるようなプライマーセット、(4)近縁ウイルスの塩基配列との相関性がない部分に結合するプライマーセットの4条件を満たすPCR用プライマーセットを選択した。

【0012】その1例としては、gpII-1 (5'-CGTGAAATCGCAGTCCATGATGTGG-3')とgpII-a (5'-CGTGGTAAATCCGTGTACGGTGGAA-3')が挙げられる。これらのプライマーは、ホスホアミダイト法等で合成することができる。合成にあつては、DNA/RNA合成機を利用すれば便利である。

【0013】分析対象としては、VZVのDNAを含む可能性のあるサンプル、即ち、皮膚水疱あるいは血液中のリンパ球に代表される感染細胞が挙げられる。これらのサンプルより、核酸成分を抽出して、PCR用テンプレート試料として使用する。核酸成分の抽出法としては、次の方法がある。

【0014】lysis buffer (K buffer: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% Tween20, 0.45% NP40, 1mg/ml Proteinase K) に10<sup>6</sup>細胞/100μlで懸濁し、65℃で1晩インキュベートした。その後、98℃で10分間インキュベートすることで、Proteinase Kの失活およびDNAの変性を行った。その溶液をフェノール処理3回、クロロホルム処理2回を行った後、エタノール沈殿法によりDNAを回収した。これ以外にも、核酸成分の抽出法としては、上記lysis bufferでインキュベートするだけの簡便法も使用できる。このようにして得られたVZVのDNAテンプレート試料及びPCR用プライマーセットを使ってPCR法を行った。最近では、PCR法用のキットや専用のシステムが市販されているので、これを利用することができる。

【0015】この結果、驚いたことにPCR法にて増幅された増幅産物は、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけた後、エチジウムブロマイド染色法にて解析することが可能なほど大量に得られていることが明らかになり、本発明の完成に至った。

【0016】即ち、前述のプライマーの長さ、末端の塩基、グアニン、シトシンの分布、増幅産物の大きさ、他の近縁ウイルスとの非相関性に関する選定基準はこの分野において一般的に用いられているものである。してみれば、この顕著な結果は増幅される領域の塩基配列特有の性質によると考えるほかはない。このことは、VZVの他の領域を増幅せしめる方法においては、用いるプライマーについて前述の配慮をし、その上さらにNested double PCR法を用いても、なお十分なPCR産物が得られていないことから明らかである。また、実施例において示すごとく、本発明の発明者らによっても、VZVのグリコプロテインIIの一部を増幅させた場合だけ増幅産物が十分に得られ、グリコプロテインI等他の領域を増幅させる場合には十分な増幅が行われないことが確認されている。

【0017】以上のことから本発明は次のように把握される。すなわち、VZVのゲノムDNAのうち、グリコプロテインIIをコードする領域(前記文献: Davison and Scott, J. General Virology, 67, 1986, 1759~1816において57008番目の塩基から59611番目の塩基まで)の一部をPCR法により増幅する過程を含むことを特徴とするVZVの検出方法、及び当該領域を増幅することのできるPCR用プライマーセ

ットである。

【0018】また、この場合において増幅されるグリコプロテインIIをコードする領域の一部が、VZVゲノムの58823番目の塩基から59161番目の塩基までの領域の全部またはその一部であるVZVの検出方法、及び当該領域を増幅することのできるPCR用プライマーセットである。

【0019】ここで、プライマーを選定するに際し、次のような配慮をするのが一般的である。

(1) プライマー末端がグアニンもしくはシトシンである8塩基以上30塩基以下、特に好ましくは20塩基ないし25塩基からなるプライマーセットであること。

(2) プライマー中のグアニン、シトシン含量が50%程度で、プライマーの全範囲を通じてその偏りがなく、特にアデニンまたはチミンが7残基以上並ぶことがなく、グアニンまたはシトシンが6残基以上ならぶことがないプライマーセットであること。

(3) そのプライマーセットを用いたPCR法による増幅産物が100bpないし500bpであるようなプライマーセットであること。

(4) 近縁ウイルスの塩基配列との相同性がない部分に結合するプライマーセットであること。

【0020】特に好ましくはプライマーセットのうち一方は、5'-CGTGAAATCGCAGTCCATGATGTGG-3'であり、また、もう一方が、5'-CGTGGTAAATCCGTGTACGGTGGAA-3'であるプライマーセット及び、これらのプライマーセットを用いるVZVの検出方法である。

【0021】もっとも、エチジウムブロマイド染色によらずに、ラジオアイソトープや蛍光プローブを使ったdot-blot法等でも解析は可能である。この場合においても増幅産物の量が多いことは解析を容易にする点で有利である。

【0022】本発明のPCR用プライマーセットを用いたPCR法によれば、HSV等の近縁ヘルペスウイルスと交差せず、かつ株間の相違なくVZVを検出できる。更にラジオアイソトープを使わずに、アガロースゲル電気泳動によるエチジウムブロマイド染色のみで、高感度(2コピーまで)にVZVを検出できる特徴を有する。従って、簡便にかつ短時間にVZVの高感度検出が可能であり、VZVが重症化する前に早期診断をすることが可能となった。

【0023】また、本発明に係るプライマーセットを含有してなる、VZV DNAを検出するためのキットを作製することができる。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

【0025】

【実施例1】

PCR用プライマーセットの設定

VZVの全遺伝子配列のうちMajor Capsid Protein (MCP)、グリコプロテインI、II、III、(gpI、II、III)をコードする領域より、下記の条件(1)から(3)を満たす部分をPCR用プライマーセットとして選出する。

【0026】(1) プライマー末端がグアニンもしくはシトシンである25塩基からなる領域

(2) プライマー中のグアニン、シトシン含量が50%程度で偏りなく分布している。特にアデニン、チミンが7塩基以上並ぶことがなく、グアニン、シトシンが6塩基以上並ぶことがないもの。

(3) プライマーセットを用いたPCR法により増幅される産物が100bp~500bpである。

以上の条件に合うプライマーセットの具体例を下記配列表に示す。

【0027】

【配列表】

【0028】配列番号：1

20 配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

CGTGAAATCGCAGTCCATGATGTGG

【0029】配列番号：2

30 配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

CGTGGTAAATCCGTGTACGGTGGAA

【0030】配列番号：3

40 配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

GTAAACTGAACGCGGTTACAAGCG

【0031】配列番号：4

50 配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

GCGCATATATCGACCGTAGCATGCT

【0032】配列番号: 5

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: その他 合成DNA

配列

CGTGCTTCTGAATCGTACTTTGTGCG

【0033】配列番号: 6

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: その他 合成DNA

配列

CGACGCAACGATTTCGGTAACGTTAT

【0034】配列番号: 7

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: その他 合成DNA

配列

CAAAGACTCATTGAGGTGTCAGTGG

【0035】配列番号: 8

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: その他 合成DNA

配列

CTGTCCGAAGTACTTTCAAGACACC

【0036】即ち、配列番号1で示されるプライマー (gpII-1) と、配列番号2で示されるプライマー (gpII-a) とからなるプライマーセット (gpI I)、配列番号3で示されるプライマー (gpIII-2) と配列番号4で示されるプライマー (gpIII-a) とからなるプライマーセット (gpIII)、配列番号5で示されるプライマー (MCP-1) と、配列番号6で示されるプライマー (MCP-2) とからなるプライマーセット (MCP)、及び配列番号7で示されるプライマー (gpI-1) と、配列番号8で示されるプライマー (gpI-a) とからなるプライマーセット (gpI) の4組である。gpII、gpIII、MCP、gpIはそれぞれ339bp、145bp、245bp、369bpの領域を増幅し得るプライマーセットである。

【0037】合成に先立ち、以上のプライマーについて、Gene BANKに登録されている2860種 (4746881塩基) のDNAに対して、コンピューターによるホモロジー検索を行い、相同性がほとんど

ないことを確認した。プライマーの合成はDNA/RNA合成機 (Applied Biosystems Inc., model 392) を用いてホスホアミダイト法で行った。

【0038】

【実施例2】

各種プライマーセットによるVZVの検出

VZV (河口株) 感染HEL (ヒト胎児肺) 細胞をlysis buffer (K buffer: 50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH8.3)、3mM MgCl<sub>2</sub>、0.45% Tween 20、0.45% NP40、1mg/ml Proteinase K) に10<sup>6</sup>細胞/100μlで懸濁し、65℃で1晩インキュベートした。その後、98℃で10分間インキュベートすることで、Proteinase Kの失活およびDNAの変性を行った。その溶液をフェノール処理3回、クロロホルム処理2回を行った後、エタノール沈殿法によりDNAを回収した。

【0039】ここで用いたHEL細胞は、富山医科薬科大学医学部ウイルス学教室 白木公康氏より分与されたものである。もっとも、これ以外にも、ヒト二倍体肺細胞として同一の、MRC-5 (ATCC登録番号CCL171)、WI-38 (ATCC登録番号CCL75) 等を用いることができる。

【0040】次に45μlの反応液 (終濃度50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH8.3)、1.75mM MgCl<sub>2</sub>、0.01%ゼラチン、dNTP各200μM、1.25unit Taqポリメラーゼ、PCR用上流、下流プライマー各20pmol) に、5μlのテンプレート (上記のDNAを10倍段階希釈したもの) を加えてPCR法を行った。PCR法は92℃で1分間→60℃で2分間→72℃で3分間を1サイクルとし、各サイクル毎に最終ステップを0.06分間延長しながら30サイクル行った (CETUS9600を使用)。

【0041】この1回目のPCR (以下「first PCR」という) の産物の1/10をテンプレートとして、再度同様の方法を用いて2回目のPCR (以下「repeated PCR」という) を行った。first PCR、repeated PCRによる増幅産物は、1.5%アガロースゲル (SeakEM GTG、TBE buffer: 45mM Tris-borate/lmM EDTA) の電気泳動にかけた後、エチジウムブロマイド染色を行って、UV照射下で解析した。分子量マーカーとしてφX174/HaeIII digest (Marker 4、ニッポンジーン (株)) を用い、増幅産物の大きさを確認した。

【0042】図1から図4は、それぞれプライマーセットgpII、gpIII、MCP及びgpIを用いたfirst PCR (それぞれの図中 (a)) 及びrepeated PCR (それぞれの図中 (b)) の増幅産物

を、1.5%アガロースゲル電気泳動にかけた結果を示す。図中レーン1~5は、VZV感染HEL細胞より抽出したDNAをそれぞれ $\times 1$ 、 $\times 10^1$ 、 $\times 10^2$ 、 $\times 10^3$ 、 $\times 10^4$ 希釈してPCR用テンプレートとした場合を示す。レーン6はテンプレート無し(蒸留水を使用)の場合を示す。レーンMは分子量マーカー(Marker 4)である。右側の矢印は、予想される増幅産物の分子量を示す。

【0043】first PCRでは、使用した4種類のプライマーセットのいずれを用いても、検出限界( $\times 10^2$  希釈)に差はなかった。しかし、repeated PCRでは、プライマーセットgpIIで行った増幅結果のみ、検出感度が $10^3$ 倍上昇しており、他の3種のプライマーセットでは、感度上昇が見られなかった。この結果より、プライマーセットgpIIを、VZV高感度検出用プライマーセットと決め、以下の研究を行った。

【0044】

【実施例3】

VZV高感度検出用プライマーセット(gpII)を使ったrepeated PCRによるVZVの検出感度

(a) 感度検定用gpII部分領域DNAの調製

PCR用プライマーセットgpIIにより増幅されるVZVの遺伝子領域(VZVのゲノムDNAの58823番目の塩基から59161番目の塩基まで)を含むgpIIの部分領域(同58636番目の塩基から59379番目の塩基まで)を、VZV感染HEL細胞から抽出したDNAをテンプレートとして、PCR法により増幅した。このとき上流プライマーにEcoRIサイト、下流プライマーにはPstIサイトをあらかじめ作っておき、これらの制限酵素サイトを用いて、pUC118ベクターに組み込んだ。このプラスミドを大腸菌(JM109株)にトランスフォームし、得られたトランスフォーマントを300mlのスケールで培養した。この培養液中の大腸菌よりアルカリ法(QIAGEN, BIAGEN社)を使ってプラスミドDNAを調製した。以後、このプラスミドDNAを感度検定用gpII部分領域DNAとして使用した。ここで、感度検定用gpII部分領域DNAのDNA濃度は、260nmでの吸光度により算出した。また、ウイルスのコピー数への換算は、この感度検定用のgpII部分領域DNAを有するプラスミドが3873bpであることと、DNAの平均ヌクレオチド分子量が330であることを使って行い、感度検定用gpII部分領域DNAの4.25agが1コピーと決めた。なお、このプラスミドDNA上の塩基配列がVZV遺伝子の塩基配列と一致していることは、DNAシーケンサーを使って確認した。

【0045】(b) 検出感度の検定

上記(a)で調製した感度検定用gpII部分領域DNAを $1.9 \times 10^{-1}$ コピー~ $1.9 \times 10^4$ コピーの濃度に希釈し、PCRプライマーセットgpIIを使用して、

実施例2で示したrepeated PCRを行った。その増幅産物を1.5%アガロースゲル電気泳動にかけた後、エチジウムブロマイド染色した結果を図5に示した。図中、レーン1は $1.9 \times 10^4$ コピー、レーン2は $1.9 \times 10^3$ コピー、レーン3は $1.9 \times 10^2$ コピー、レーン4は $1.9 \times 10^1$ コピー、レーン5は $1.9 \times 10^0$ コピー、レーン6は $1.9 \times 10^{-1}$ コピーのDNAテンプレート濃度でPCRを行った場合を示す。レーン7はテンプレートDNAなし(蒸留水を使用)の場合を示す。レーンMは、分子量マーカー(Marker 4)である。また、本プライマーセットを使った場合の予想される増幅産物の分子量(339bp)を矢印で示す。

【0046】図5より、プライマーセットgpIIによるrepeated PCRによるVZVの検出限界は1.9コピーであることがわかる。この感度があれば、VZV感染症の発症前の患者より採取した血液(リンパ球)からでもVZVを検出することが可能である。なお、gpII-1と、3'末端側の4塩基を欠いたgpII-aとからなるプライマーセットによる増幅においても、gpII-aを用いた場合と同様の結果が得られた。

【0047】

【実施例4】

VZVの他株との交差反応性

実施例2で使用した河口株とは疫学的に異なるVZVのOka株(ワクチン株)、Batson株についてもプライマーセットgpIIによるPCR法で検出可能であることを確認した。ここでVZV河口株及びOka株は大阪大学微生物病研究所麻疹部門 山西弘一氏より分与されたものであり、同所に分与を申込むことができる。またBatson株は福島医科大学細菌学教室 茂田士郎氏より分与されたものである。方法は、実施例2と同様に行い、河口株感染HEL細胞の代わりに、Oka株感染HEL細胞、及びBatson株感染HEL細胞よりテンプレートDNAを調製し、repeated PCRを行った。

【0048】repeated PCRによる増幅産物の1.5%アガロースゲル電気泳動像を図6に示した。図中、レーン1はVZV Oka株感染HEL細胞から抽出したDNAを、レーン2はVZV Batson株感染HEL細胞から抽出したDNAを、レーン3はVZV河口株感染HEL細胞から抽出したDNAをそれぞれテンプレートDNAとして使ってPCR法を行った場合を示す。レーンMは、分子量マーカー(Marker 4)である。また、本プライマーセットを使った場合の予想される増幅産物の分子量(339bp)を矢印で示す。

【0049】河口株と同様に、Oka株、Batson株とも予想される増幅産物(339bp)が確認できた。以上より、PCR用プライマーセットgpIIを用い

たrepeated PCRにより、株間の相違なく、VZVを検出することが可能であった。

【0050】

【実施例5】

VZVの近縁ヘルペスウイルス（HSV1、HSV2、CMV）との交差反応性

VZVの近縁ヘルペスウイルス（HSV1、HSV2、CMV）に対して、PCR用プライマーセットgpIIを用いたrepeated PCRで核酸の増幅が行われないことを確認した。方法は、実施例2と同様に、VZV（河口株）感染HEL細胞、HSV-1、HSV-2、またはCMV感染HEL細胞よりテンプレートDNAを調製し、プライマーセットgpIIを用いたrepeated PCRを行った。

【0051】 repeated PCRによる増幅産物の1.5%アガロースゲル電気泳動像を図7に示した。図中、レーン1はHSV1感染HEL細胞から抽出したDNAを、レーン2はHSV2感染HEL細胞から抽出したDNAを、レーン3はCMV感染HEL細胞から抽出したDNAを、レーン4はVZV（河口株）感染HEL細胞から抽出したDNAを、それぞれテンプレートDNAとして用いてPCR法を行った場合を示す。レーンMは、分子量マーカー（Marker 4）である。また、VZVの場合に予想される増幅産物の分子量（339bp）を矢印で示す。

【0052】 repeated PCRによる増幅産物のバンドは、テンプレートとしてVZVを用いたときには339bpに検出できるが、HSV-1、HSV-2、及びCMVの場合は検出されなかった。このことよりプライマーセットgpIIを用いたrepeated

PCRは、VZVと近縁のウイルスであるHSV-1、HSV-2、およびCMVと交差することなく、VZVを特異的に検出することができた。

【0053】

【発明の効果】本発明のプライマーセットを用いた水痘帯状疱疹ウイルスの検出方法によれば、同ウイルスを、その株の種類によらずに、また他の近縁ヘルペスウイルスに交差反応をすることなく、迅速かつ高感度に検出することができる。かくして、同ウイルス感染症の早期治療を可能にする迅速診断法が確立された。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のプライマーセットgpIIを用いてのVZV検出結果を示す電気泳動の図面代用写真である。

【図2】図2は、プライマーセットgpIIIを用いてのVZV検出結果を示す電気泳動の図面代用写真である。

【図3】図3は、プライマーセットMCPを用いてのVZV検出結果を示す電気泳動の図面代用写真である。

【図4】図4は、プライマーセットgpIを用いてのVZV検出結果を示す電気泳動の図面代用写真である。

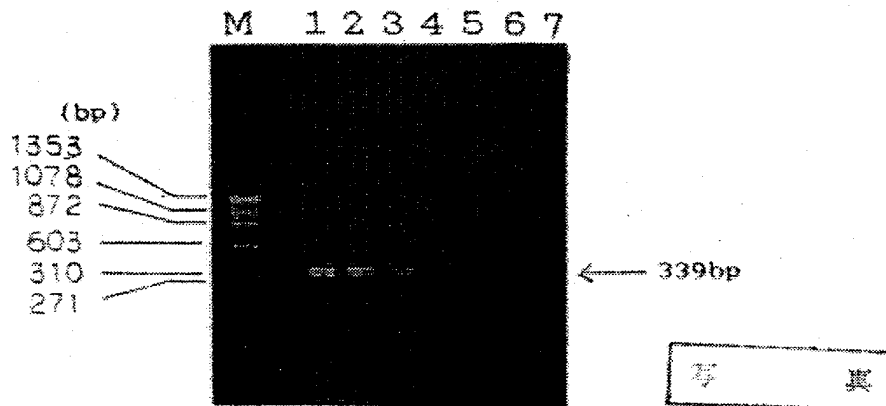
【図5】図5は、本発明のプライマーセットgpIIを用いた場合の、VZV検出感度の評価結果を示す電気泳動の図面代用写真である。

【図6】図6は、本発明のプライマーセットgpIIを用いた場合の、各種VZV株との交差反応性を示す電気泳動の図面代用写真である。

【図7】図7は、本発明のプライマーセットgpIIを用いた場合の、VZVの近縁ヘルペスウイルスとの交差反応性を示す電気泳動の図面代用写真である。

【図5】

図面代用写真





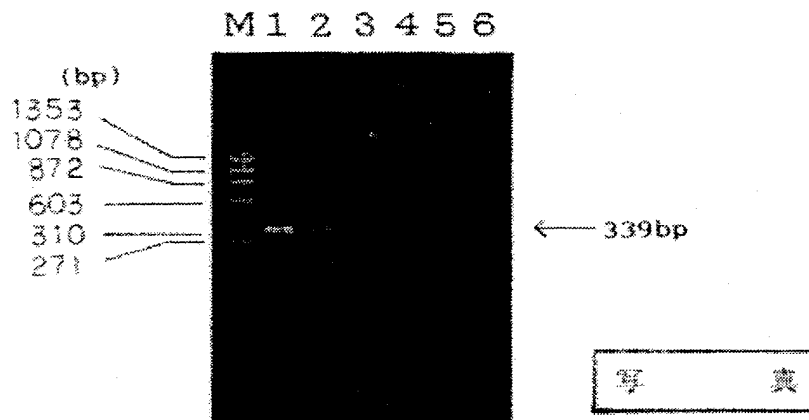
(8)

特開平7-199

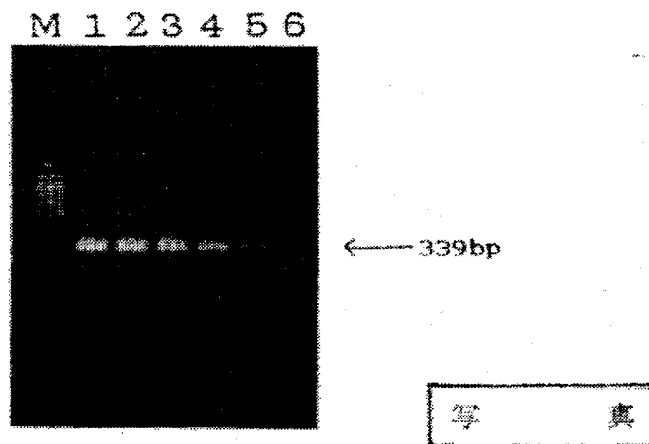
【図1】

図面代用写真

(a)



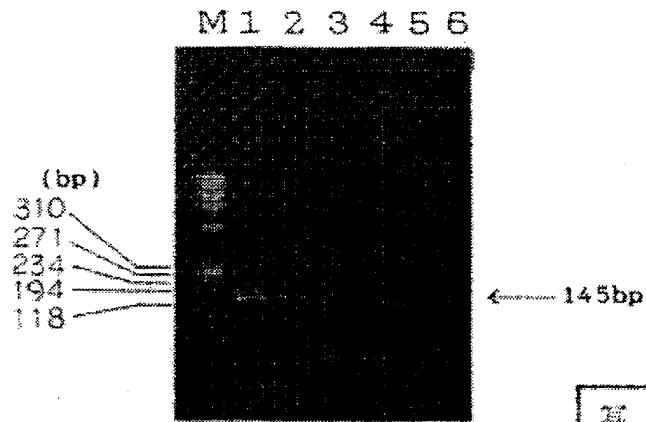
(b)



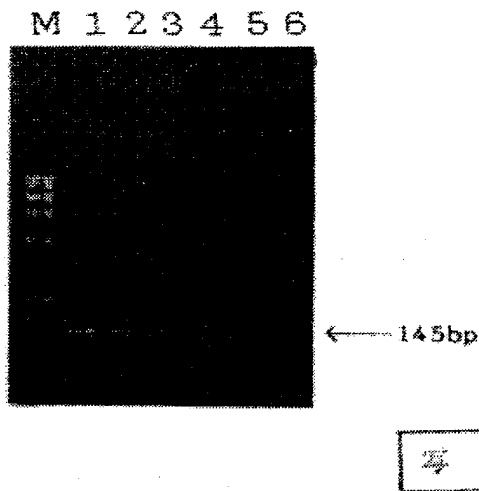
【図2】

(a)

開通代形写真



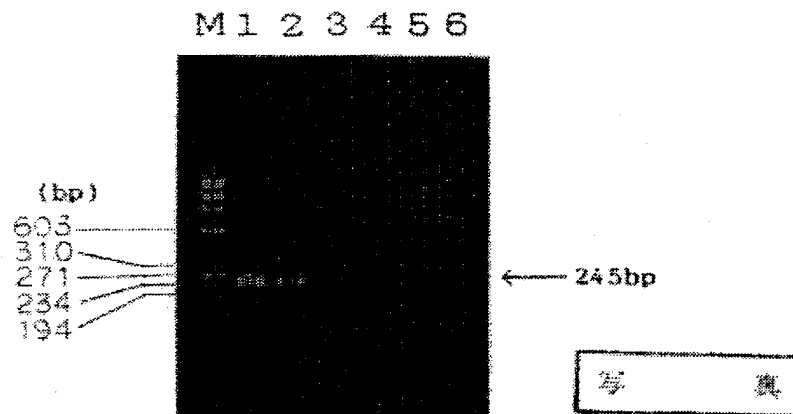
(b)



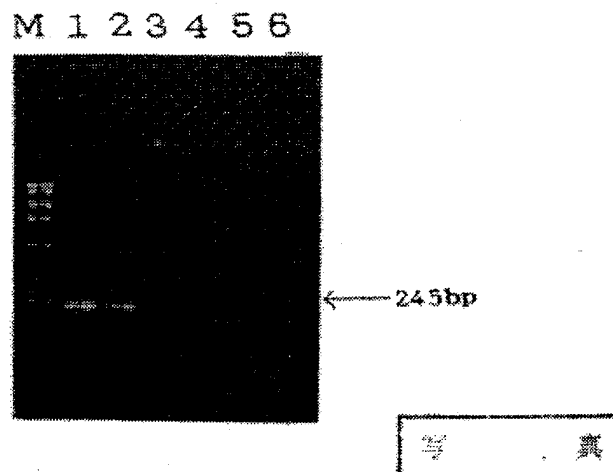
【図3】

図面代用写真

(a)



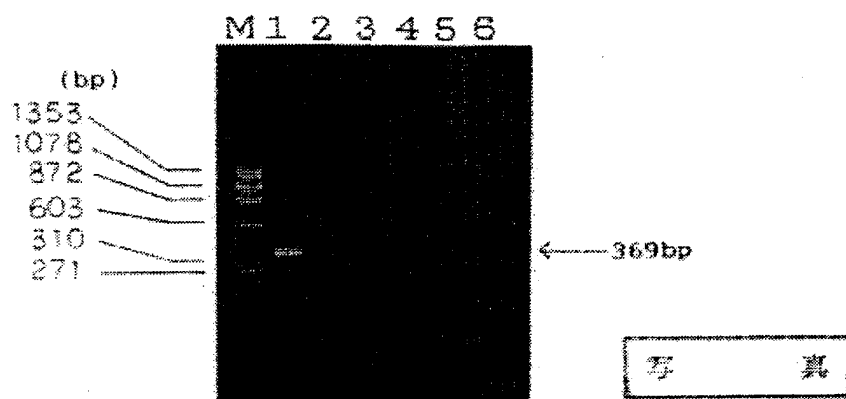
(b)



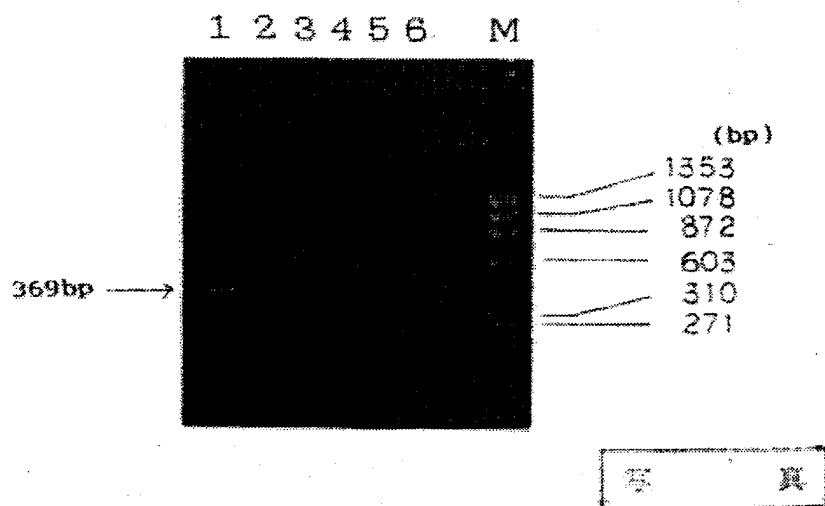
【図4】

図面代用写真

(a)

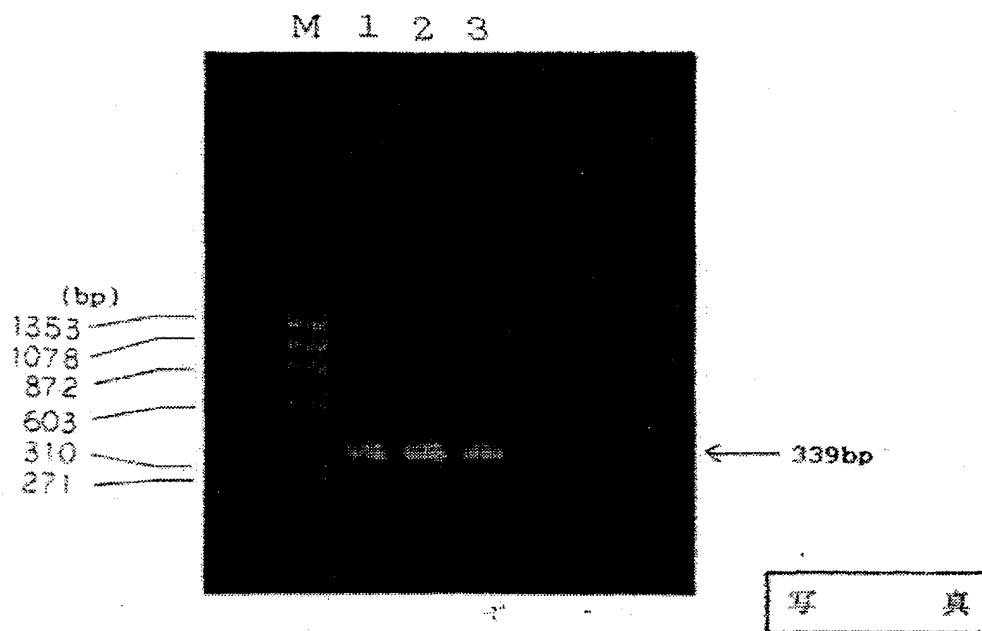


(b)



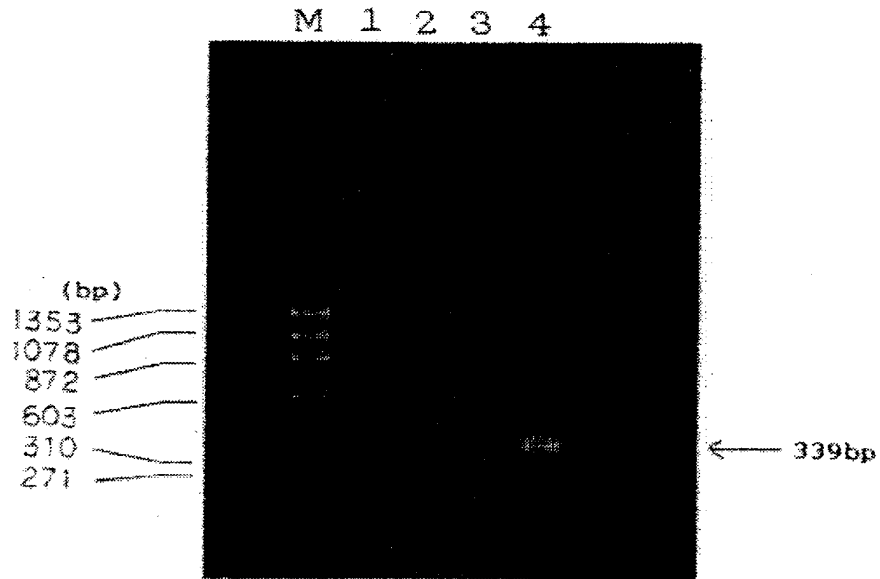
【図6】

図面代用写真



【図7】

図面代用写真



写真

フロントページの続き

(72)発明者 友森 チエリ

東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人  
株式会社東京研究センター内